

廃用性萎縮モデルマウスに対する鍼通電療法の効果の検証

福林 徹¹

(¹ 早稲田大学スポーツ科学学術院)

【研究課題】

本研究は2009年度から継続中であり、鍼通電療法による廃用性筋萎縮抑制効果を検証した研究である。超高齢社会を迎えた我が国では日々の健康状態に留意し、骨格筋の萎縮予防に適切な対処法を行う必要がある。骨格筋は可塑性に富むゆえに、適度な運動や栄養の改善などを行うことによって筋力維持は可能である。しかし、実際には寝たきりや転倒・骨折などによるギプス固定を強いられ、廃用性筋萎縮を引き起す症例はすくなくない。高齢者や怪我をした患者では、運動療法や食事療法によらない補完的治療法が求められることも多い。鍼治療は東洋医学を代表する代替療法の一つであるが、その作用機序は科学的に証明されてきたとは言い難く、分子生物学的な解析はほとんどなされていない。鍼治療は臨床の現場において、筋血流の改善や筋疲労の回復などに用いられていることから、骨格筋疾患に対しても対処可能な治療法の一つである。これまでの先行研究により骨格筋萎縮を引き起すメカニズムとして、サルコメアを特異的に分解するE3ユビキチンリガーゼが骨格筋分解経路の中心的役割を果たしていることが報告されている。そこで本研究では、鍼治療が骨格筋萎縮を抑制するという仮説を立て、遺伝子発現動態を検証する実験プロトコルを設定し、本研究を行った。

【2010～2013年度 進捗状況報告】

本研究では、研究内容を3つの段階に分けて解析を行った。まず研究課題1として鍼治療による骨格筋萎縮抑制効果の有無を検証するため、後肢懸垂型筋萎縮モデルマウス(C57 BL/6, 8週齢, 雄)を用いて鍼治療による介入実験を行なった。群分けは、対照群、後肢懸垂群、置鍼群、鍼通電群の4群とした。ペントバルビタール系麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下の鍼通電群に、直径0.12mmのディスプレイ鍼を用いて、両肢腓腹筋遠位部2カ所に頻度1 Hz、強度6.5mAの通電鍼刺激を1日30分間、2週間連続して施行した。置鍼群は鍼通電群と同様に1日30分間鍼を腓腹筋中に置き、電気刺激は行わなかった。鍼治療効果の評価として、ヒラメ筋湿重量ならびに筋線維断面積を定量計測した。また、骨格筋萎縮を引き起す原因遺伝子として、E3ユビキチンリガーゼを含めた骨格筋合成／分解経路の代表的な遺伝子のmRNA発現量をRT-PCRによって定量化した。その結果、置鍼法によってヒラメ筋湿重量は有意に増加し ($p<0.05$)、鍼通電療法によって筋湿重量と筋線維断

面積は有意に増加した (各 $p<0.001$, $p<0.05$)。反対にE3ユビキチンリガーゼであるatrogin-1のmRNA発現量は置鍼法ならびに鍼通電療法によって有意に減少した (各 $p<0.01$, $p<0.001$)。また、もう一つのE3ユビキチンリガーゼであるMuRF1の発現量は鍼通電療法によって有意に減少した ($p<0.05$)。さらに置鍼法によってAkt1やTRPV4のmRNA発現量が有意に上昇することが検証された (各 $p<0.001$, $p<0.05$)。本研究の結果から、鍼治療は筋萎縮抑制に効果がある可能性が解明されたが、鍼通電療法によって発現量が変動する遺伝子がE3ユビキチンリガーゼのみであるとは考えにくく、骨格筋の恒常性維持に関わる他の遺伝子が鍼通電療法によってどのような振る舞いをするのかについての発現動態はほとんど検証されていない。

研究課題2では、cDNAマイクロアレイを用いて約3万個の全遺伝子の中から、後肢懸垂ならびに鍼通電療法によって発現量が変動する標的遺伝子の網羅的探索を行った。本研究の結果から後肢懸垂によって発現量が減少し、その減少した発現量が鍼通電療法によって改善する遺伝子として25個の遺伝子が抽出された。そのなかでも第2次リンパ組織ケモカインであるCCL21が、Real-time PCRによって後肢懸垂並びに鍼治療に関与している可能性が高いことが検証された。CCL21は血液中に存在しているケモカインであるが、インテグリンという接着因子を活性化することによって、リンパ球の細胞外遊走を促進する働きがあるので、鍼治療は免疫系を活性化することが示唆された。反対に後肢懸垂によって発現量が増加し、鍼通電療法で減少する遺伝子として35個の遺伝子が抽出された。そのなかでも細胞外マトリックスメタロプロテアーゼファミリー (MMPs) からは4個の遺伝子が抽出された。MMPsは亜鉛とカルシウム依存性の分解酵素であり、細胞の分化／増殖並びに血管新生、アポトーシスなどに関与することが報告されている。Real-time PCRにより、MMP-13のmRNA発現量を定量化した所、後肢懸垂によって500倍近い発現量の増加が認められたことから ($p<0.05$)、MMPsが後肢懸垂に関与する遺伝子である可能性が示唆された。

研究課題2の結果から、鍼治療は後肢懸垂型骨格筋萎縮に対して有効である可能性が強く示唆された。しかし、後肢懸垂型筋萎縮モデルは重力免荷型手法である。寝たきりやギプス固定等による不活動型とは、筋萎縮を引き起すメカニズムが異なるものと考えられる。さらに実際の整形

外科やスポーツ医学の分野では、安静臥床やギプス固定などによって引き起される不活動型廃用性萎縮などの方が多いのが現状である。また、ギプス固定解除後に行なう機能回復の為のリハビリテーションは高齢者にとっては容易ではなく、またギプス固定中に進行する骨格筋萎縮に対する治療法は未だに確立していないのが現状である。不活動型固定による骨格筋萎縮に対する鍼治療の萎縮抑制効果の解明が必要である。実際の研究条件において、進行性の骨格筋萎縮に対するアプローチが困難な理由は、その固定具の脱着の困難さである。よって、研究課題3ではこれらの事情を鑑み、進行性の固定型骨格筋萎縮に対するアプローチを可能とするため、針金を用いた螺旋ワイヤーによる固定方法を考案した。我々は足関節を底屈位に固定し、両肢をワイヤーで固定する方法を考案したが、その際参考としたのはイリザロフ外固定手術による骨延長手術である。この方法は、切断した骨の外周をワイヤーで固定することによって骨の延長を可能とするものである。本モデルはイリザロフ法にさらに改良を加え、ワイヤーを螺旋状に巻くことによって簡便かつ実験に使用しやすい不活動型固定モデルを考案したものである。このワイヤー固定モデルの特徴は、1. 皮膚の状態を目視確認できること、2. 方法が簡便かつ安価であること、3. 巻き戻しが可能であることによって、固定中に進行する筋萎縮に対して治療が可能であるという長所がある。研究課題3では、まず5日間の螺旋ワイヤー固定を行ない、モデルの有効性を検証した。そしてその有効性を検証した後、その後2週間のワイヤー固定を行ない、鍼通電療法の不活動型骨格筋萎縮に対する効果を検証した。群分けは対照群、ワイヤー固定群、置鍼群、鍼通電群の4群とし、実験条件は研究課題1と同様の介入実験を行なった。2週間の固定の結果、ヒラメ筋の筋湿重量は、置鍼ならびに鍼通電療法によって、有意に回復した（各

$p<0.01$, $p<0.001$ ）。この結果は、後肢懸垂型筋萎縮に対する鍼治療の効果と同様の傾向が見られた。E3ユビキチンリガーゼatrogin-1の発現量は、鍼通電療法によって有意に回復したことから（ $p<0.05$ ）、鍼治療は固定型筋萎縮に対しても有効である可能性が示唆された。

【結論】

本研究は実験動物を用いて、後肢懸垂型ならびに固定型の廃用性萎縮に対する鍼刺激の萎縮抑制効果を確認したものである。筋細胞内サルコメア分解の経路では萎縮関連遺伝子E3ユビキチンリガーゼatrogin-1やMuRF1のmRNA発現は2週間の鍼刺激によって有意に抑制されることを証明した。またマイクロアレイを用いた実験によって、細胞外基質の分解経路のMMPsが大きな役割を果たしている可能性があることや、免疫系を活性化する経路に第2次リンパ組織ケモカインであるCCL21などの標的遺伝子が鍼通電療法によって改善される可能性を解明することができた。しかし、本研究はヒラメ筋の遺伝子発現のみを研究の対象としており、プロモーター解析を含めた上流のシグナル伝達経路の転写因子などの研究は行っていない。また、神経／ホルモンの影響やCGRPやNOなどの介在物質の影響は、先行研究による候補遺伝子の発現変動報告から推測の域を出ず、具体的な上流・下流のシグナル伝達系標的遺伝子の影響の検討はできなかった。また、鍼通電療法がミトコンドリアやサテライトセルに与える影響やファイバータイプによる遺伝子の発現量の違い、また酸化ストレスの増大によって生じる活性酸素の影響の検討まで着手できなかったことが本研究の限界である。今回の一連の研究の結果から鍼治療は重力免荷型ならびに不活動型固定による筋萎縮の抑制に有効であり、そのメカニズムとしてatrogin-1, MuRF1, MMPs, Akt1, TRPV4, CCL21などの標的遺伝子発現を変化させる可能性が示唆された。